

スフィンゴシン-1-リン酸受容体によるがん浸潤・転移の制御 受容体サブタイプ特異的な促進・抑制二方向性制御とその分子機構

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4491

【総説】

スフィンゴシン-1-リン酸受容体によるがん浸潤・転移の制御
受容体サブタイプ特異的な促進・抑制二方向性制御とその分子機構

S1P₂ G protein-coupled receptor negatively regulates Rac, cell migration,
chemoinvasion and experimental metastasis

金沢大学大学院医学系研究科血管分子生理学

多久和典子

はじめに

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、血漿中に存在する生理活性リゾリン脂質であり、様々な細胞において細胞増殖促進、抗アポトーシス、細胞分化誘導、細胞骨格・細胞運動調節、神経突起退縮、血管収縮などの多様な生物活性を引き起こすことから注目を集めて来た。なかでも注目されたのは、細胞の種類に応じて細胞運動を促進あるいは抑制するという、相反する二方向性の制御作用であった。特に、ある種のがん細胞の遊走と浸潤の *in vitro* における抑制作用は、他にほとんど例を見ない S1P 固有の生物作用であり、治療的観点からも注目を集めた。S1P は血漿中に約 200 nM、血清中に約 600 nM の濃度で存在し、その多くは血漿蛋白に結合している。活性化血小板から大量に放出されることから、血小板活性化を伴う様々な病態における関与が従来から推定されている。また、S1P を産生するスフィンゴシン キナーゼならびに S1P 分解酵素である S1P リアーゼはいずれも酵母の段階から同定されており、真核生物における S1P の重要性を示唆している。

1990年代前半に我々や海外の数グループが血管壁構成細胞や脳の cDNA ライブラリーから相互に相同性の高い受容体群をクローニングしていた。これらは、細胞膜を7回貫通する構造を有し、リガンド結合によって活性化されると細胞内領域で三量体 G 蛋白 ($\alpha\beta\gamma$ サブユニットから構成される) と会合することにより細胞内にシグナルを発する、いわゆる G 蛋白共役型受容体である。(ちなみに、このタイプの受容体はあらゆる受容体のうち最大のファミリーであり、現在用いられている医薬品の半分近くは G 蛋白共役型受容体をターゲットとしているとのことである。) 1998~1999年に至り、これらが S1P をリガンドとする受容体であることが判明した。S1P の生物活性の多くはこれらの受容体を介する作用として説明できることが明らかとなった^{1,7)}。これと相前後して、S1P と類似した立体構造を有する血清中の古典的生理活性リゾリン脂質であるリゾホスファチジン酸 (LPA) に対する受容体が、S1P 受容体とともに同一の受容体ファミリーを構成していることが明らかにされている。これらは、最初に報告された *endothelial differentiation gene* (血管内皮細胞において分化刺激により発現が誘導される *immediate early gene* として報告された) に因んで Edg ファミリー G 蛋白共役型受容体と総称されて来た。最近、各アイソフォームの発見の順に従った新命名体系が採用されている (S1P₁~S1P₅ならびに LPA₁~LPA₃) (表1)。

我々は、S1P による細胞運動の促進・抑制という、相反する二方向性の制御作用が、それぞれ異なる S1P 受容体サブタイプにより媒介されていることを見出した。特に、われわれ自身がかつてクローニングし、S1P をリガンドとして同定した S1P₂ 受容体 (=AGR16, Edg5) が、細胞遊走の抑制性制御を媒介する最初の G 蛋白共役型受容体であることを明らかにした。さらに、がん細胞に内因性に発現する S1P₂ 受容体が S1P 依存性に実際ががん細胞の遊走、浸潤、血行性転移の抑制性制御を媒介することを見出した。一方、S1P₁、S1P₃ 受容体は逆にこれらの促進 (増悪) を媒介した。本稿ではこのような、同一のリガンドによる、受容体サブタイプ特異的な正・負二方向の制御がいかなる分子機構に基づいているのか、またその病態生理学的意義についてご紹介したい。

1. S1P₁、S1P₃ は三量体 G 蛋白 Gi-単量体低分子量 G 蛋白 Rac 経路を介して化学遊走受容体として機能する。一方、S1P₂ は Rac を抑制し、化学遊走抑制性受容体として機能する S1P 受容体のうち、S1P₁/Edg1、S1P₂/Edg5、S1P₃/Edg3 は広汎に発現している。一方、S1P₄/Edg6、S1P₅/Edg8 の発現はそれぞれ造血・リンパ球系、神経系にほぼ限局されている。我々は CHO (Chinese hamster ovary) 細胞安定強発現系を用いて、当時はリガンドが不明でオーファン受容体であった S1P₁/Edg1、S1P₂/Edg5、S1P₃/Edg3 の3つが S1P を生理的リガンドとすることを見出し、その細胞内情報伝達機構の異同を明らかにした (図1)。これらはいずれも三量体 G 蛋白の Gi と共役して細胞増殖促進の情報伝達系である Ras-ERK/MAP キナーゼ経路を活性化し (S1P₁ ≥ S1P₃ > S1P₂)、また、Gi (S1P₁) あるいは Gq (S1P₂ < S1P₃) と共役してホスホリパーゼ C を活性化し、その結果カルシウム動員と C キナーゼ活性化を引き起こす。さらに S1P₂ と S1P₃ (S1P₂ ≈ S1P₃) は G_{12/13} を介し単量体低分子量 G 蛋白の Rho を活性化する。

表1. Edg 受容体ファミリー

	Edg 命名法	新命名法	発現組織	文献
S1P 受容体	Edg1	S1P ₁	広範囲に発現	Hla and Maciag (1990)
	Edg5 (=AGR16)	S1P ₂	広範囲に発現	Okazaki et al. (1993)
	Edg3	S1P ₃	広範囲に発現	Yamaguchi et al. (1995)
	Edg6	S1P ₄	リンパ組織・肺	Graler et al. (1998)
	Edg8	S1P ₅	神経系	Niedernberg et al. (2002)
LPA 受容体	Edg2	LPA ₁	広範囲に発現	Masana et al. (1995)
	Edg4	LPA ₂	神経系、腎、睾丸、肺	An et al. (1998)
	Edg7	LPA ₃	睾丸、前立腺、心、脳、肺、腎	Bandoh et al. (1999)

この系を用いて、S1Pによる細胞運動の促進性あるいは抑制性の制御がS1P受容体サブタイプ特異的に媒介されていることを見出した⁴⁾。すなわち、S1P₁とS1P₃は白血球のケモカイン受容体と同様、G_iに共役し、S1Pの濃度勾配に反応して化学遊走を惹起する受容体として機能する。一方、S1P₂は、他の走化因子や成長因子 (CHO細胞の場合はインスリン様成長因子-I, IGF-I) に対する化学遊走をS1P依存性に抑制する、ユニークな受容体であることが分かった (図2)。

さて、Rhoファミリー低分子量G蛋白、Rac、Rho、Cdc42は各々独自のパターンのアクチン骨格再編成を担い、細胞運動の調節に関与するシグナル分子として近年注目を集めている。これらの優性不活型変異体やRhoを選択的に不活化するボツリヌスC3毒素を用いた検討から、CHO細胞や後述のマウスメラノーマ細胞の細胞遊走においてRac、Cdc42の活性はどちらも必要であるが、Rhoの活性は必ずしも必要ないことが分かった^{4,7)}。各S1P受容体サブタイプによるRacの活性制御を解析した結果、細胞運動に対する制御作用に一致して、S1P₁ならびにS1P₃はG_iに共役してRacを活性化した。一方、S1P₂は、他の化学遊走刺激にตอบสนองしたRac活性化をS1P依存性に完全に阻害した (図3)^{4,7)}。G蛋白共役型受容体に限らず、あらゆるタイプの受容体を通じて、S1P₂はRac抑制を媒介することが証明された最初の受容体である^{5,7)}。なお、Cdc42は比較的高い基礎活性を示し、成長因子やS1Pによる制御を受けなかった⁴⁾。

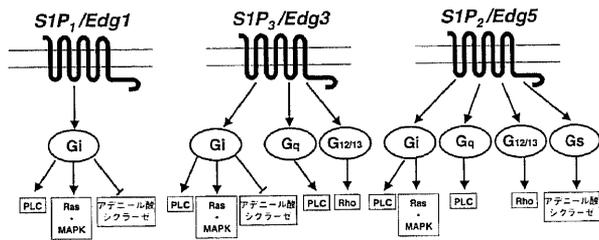


図1. S1P₁, S1P₃, S1P₂の細胞内情報伝達。
→は活性化, ←は抑制を表す。PLC; ホスホリパーゼC, MAPK; MAPキナーゼ。

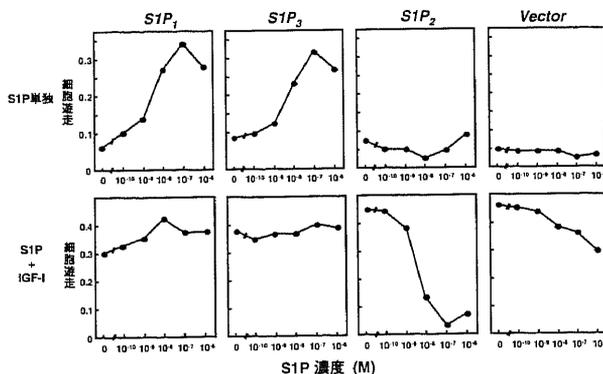


図2. S1P₁, S1P₃受容体はS1Pに対する化学遊走を伸介し、S1P₂受容体は他の化学走化因子に対する遊走の、S1Pによる抑制を伸介する。各受容体サブタイプを強発現させたCHO細胞に種々の濃度のS1Pを単独で (グラフ上段)、あるいはインスリン様成長因子-I (IGF-I) と共に (下段) 作用させ、ポインデンチェンバー法により細胞遊走を定量した。

2. S1P₂はG_{12/13}-Rhoを介してRac・化学遊走の抑制を引き起こす

S1P₂受容体を介したRac・細胞遊走の抑制はAlF₄⁻ (三量体G蛋白αサブユニットに直接結合してこれを活性化する) により模倣されることから、何れかの三量体G蛋白が関与していると推測された⁸⁾。それぞれのGαサブユニットC末端ペプチド (Gαと受容体細胞内領域との結合を競合阻害する)、βアドレナリン受容体キナーゼ (βARK) C末端ペプチド (βγを捕捉する) やS1P₂-Gα融合受容体をアデノウイルスを用いて細胞内に発現させることにより、Rac・化学遊走の抑制に共役する三量体G蛋白の同定を試みた。その結果、G_{12/13}のαサブユニットのみが、S1P₂受容体によるRac・化学遊走の抑制作用を特異的に媒介した⁸⁾ (図3)。

さらに、G_{12/13}がどのような機序でRac・化学遊走を抑制するのかを検討した。ボツリヌスC3毒素、優性不活型あるいは優性活性型Rho変異体発現の検討から、S1P₂受容体刺激によるG_{12/13}を介したRho活性化が、Rhoキナーゼ以外のエフェクターを介してRac活性の抑制をもたらし、その結果、細胞遊走が抑制されることを見出した⁸⁾ (図3)。

3. S1P₃はG_{12/13}-Rho経路共役の強化によりS1P₂様抑制性受容体に変貌する

S1P₃はS1P₂と同様G_{12/13}に共役しRhoを活性化する (図1)。にも拘らずRac・化学遊走の促進を媒介する。このパラドックスを詳細に解析したところ、S1P₃発現細胞を百日咳毒素で前処理しておく、G_iの特異的な不活化の結果、S1PによるRac・化学遊走の活性化が完全に消失し、のみならず、S1P₃がS1P₂と全く同様にG_{12/13}を介してRac・細胞運動の抑制性受容体として機能するようになることが分かった⁸⁾。このことはG_{12/13}-Rho経路がRac抑制の上流に位置する生理的シグナルであることを示唆すると同時に、Rho活性化がRac抑制なしには細胞運動抑制を媒介できないことを意味する。G_{12/13}と共役しないS1P₁発現細胞では百日咳毒素前処理による抑制性受容体への転換は見られなかった⁸⁾。

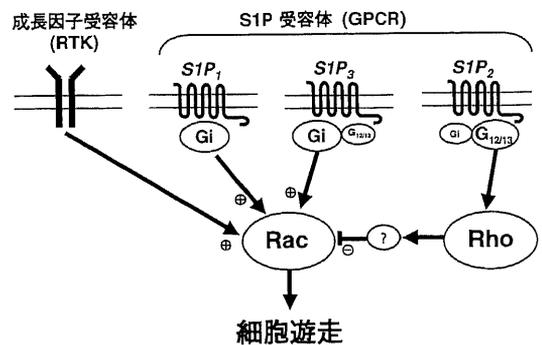


図3. S1P受容体サブタイプ特異的な細胞運動の二方向性制御の分子機構。S1P₁, S1P₃は三量体G蛋白G_iを介しRacを活性化することによりS1Pに対する化学遊走を媒介する。S1P₂はG_{12/13}-Rho経路を介し、Racを抑制することにより、細胞運動抑制受容体として機能する。(なお、LPA₁はS1P₁, S1P₃と同様の機構により、LPAによる化学遊走を媒介することが最近報告された。) RTK, 蛋白/チロシンリン酸化酵素型受容体; GPCR, G蛋白共役型受容体。

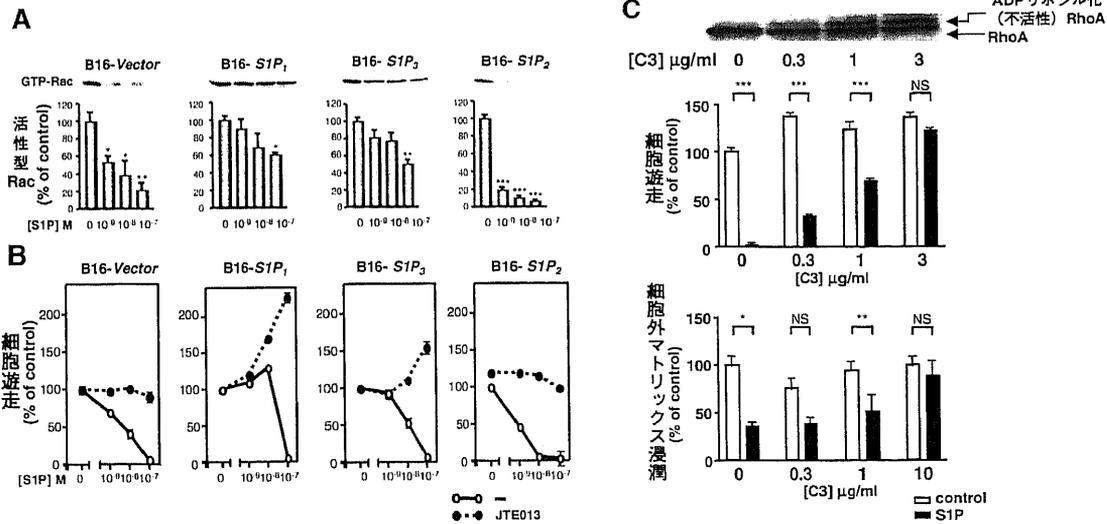


図4. マウス B16メラノーマ細胞の Rac, 細胞遊走, 浸潤の S1P 受容体を介する制御. S1P は内因性の S1P₂ 受容体を介し Rac 活性 (A) と細胞遊走 (ボイデンチェンバー法による) (B) を抑制する (vector コントロール細胞). また, S1P による Rac と細胞遊走の抑制は, S1P₂ 強発現により増強され, 逆に S1P₁, S1P₃ 強発現により減弱される. (B) S1P₂ 特異的のアンタゴニスト JTE013 存在下 (点線) では, S1P₂ を介する遊走抑制が完全に解除され, かつ, S1P₁, S1P₃ を介する細胞遊走促進作用が現れる. (C) ボツリヌス C3 毒素処理による RhoA 不活化は, B16 細胞の S1P による遊走・浸潤の抑制を解除する.

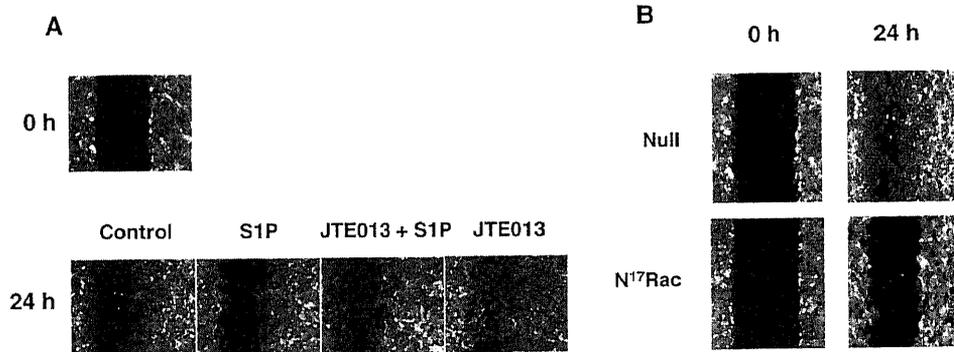


図5. B16 細胞の *in vitro* wound healing アッセイを用いた細胞遊走の評価. (A) B16 細胞の単層培養に傷をつけると二次元平面における細胞遊走により 24 時間後までに傷が修復する (control). S1P はこの "*in vitro* wound healing" を抑制し, これは S1P₂ 特異的のアンタゴニスト JTE013 により解除される. (B) 優性不活性型 Rac 変異体発現は S1P₂ を介した抑制作用を再現する.

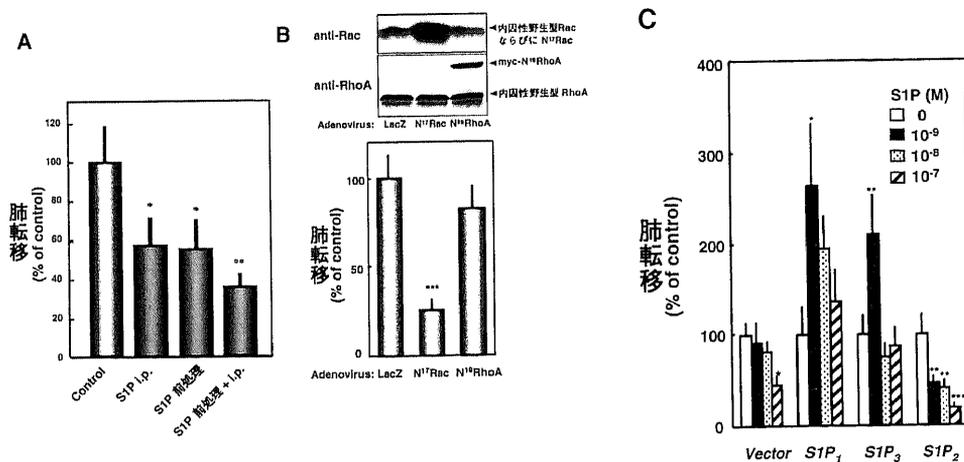


図6. B16 細胞の実験的の血行性肺転移の S1P 受容体サブタイプ特異的な制御. S1P (A), 優性不活性型 Rac 変異体のアデノウイルスベクターによる一過性発現 (B) はいずれも B16 細胞の血行性肺転移を抑制する. i. p., 腹腔内投与. (C) S1P₂ 受容体強発現は S1P の抑制効果を増強し, S1P₁, S1P₃ 強発現は逆に S1P 依存性に肺転移の増悪をもたらす.

4. S1PはマウスメラノーマB16細胞に内因性に発現するS1P₂受容体を介してその遊走・浸潤と実験的血行性転移を抑制し、S1P₁、S1P₃を介してこれらの増悪を引き起こす

マウスメラノーマB16細胞はS1Pにより細胞運動と細胞外マトリックス浸潤が抑制されるプロトタイプといえる⁹⁾が、この細胞はS1P受容体のうちS1P₂のみを内因性に発現していた。この内因性S1P₂受容体がS1PによるRacと細胞運動の抑制作用をひとえに担っていることを、S1P₂受容体選択的アンタゴニストを用い明らかにした(図4)。また、CHO細胞強発現系で観察した結果と同様、B16細胞においては内因性S1P₂受容体を介するRho活性化が、Rac抑制の上流に位置するシグナルであることを証明した¹⁰⁾(図4C)。このB16細胞にS1P₂を強発現させると、S1PによるRac、細胞運動、細胞外マトリックス浸潤の抑制効果がいずれも増強された(図4A, B)。逆に化学遊走受容体であるS1P₁あるいはS1P₃を強発現させるとS1Pの抑制効果が減弱し、さらにはS1P₂選択的アンタゴニストの存在下ではむしろS1P依存性に細胞運動と浸潤が増強されることを見出した(図4B)¹⁰⁾。S1P依存性の細胞運動抑制作用は二次元平面上でも確認され、これは優性不活型Rac変異体発現により再現された(図5)¹⁰⁾。

マウス尾静脈からB16細胞を注入すると3週間後に多数の肺転移巣が形成される。この*in vivo*血行性転移実験系において、尾静脈注入前にB16細胞をS1P前処理することによりS1P用量依存性に肺転移が抑制された(東大腫瘍外科 山口博紀博士との共同研究)(図6A)¹¹⁾。S1Pの連日腹腔内投与によっても肺転移が抑制され、S1P前処理との併用で抑制効果が増強した(図6A)。また、優性不活型Rac変異体をアデノウイルスベクターにより一過性に発現させたB16細胞を注入すると、LacZコントロール細胞に比べ肺転移が著明に抑制された(図6B)¹¹⁾。がん転移、とくにその早期においてRac活性が重要な役割を果たすことを示唆する所見である。これらの結果から、内因性S1P₂受容体を介した一過性のRac抑制がS1Pによる肺転移抑制の重要な分子機構の少なくとも一部を担うと考えられた。この*in vivo*実験系においても、B16細胞にS1P₂を強発現させると、S1P処理による肺転移抑制効果が増強され、逆にS1P₁あるいはS1P₃強発現の結果、S1P依存性に肺転移がむしろ増悪した(図6C)¹¹⁾。が

ん血行転移の初期の段階でS1Pの産生源である活性化血小板をまきこんだ微小腫瘍塞栓がまず形成されることから、局所においてS1P濃度が上昇していると推測される。また、前述のように、これらS1P受容体はがん細胞が由来するところの様々な組織に広汎に発現している。以上の知見は、S1P₂特異的アゴニストや、S1P₁あるいはS1P₃特異的なアンタゴニストががんの転移を抑制する有望な治療薬となりうることを示唆する(図7)。

5. 血管におけるS1P受容体サブタイプ特異的な細胞運動・遺伝子発現の制御とその病態生理学的意義

前述のように、S1P₂は我々がかつて血管における新たな情報伝達機構の担い手としてラット大動脈cDNAライブラリーからクローニングした¹²⁾。実際、血管平滑筋細胞ではS1P₂が高発現しており、この内因性S1P₂を介して細胞運動が抑制的に制御される(第2回高安賞最優秀賞受賞論文)¹³⁾。一方、血管内皮細胞においてはS1P₁、S1P₃が高発現しており、内皮細胞の遊走を媒介して傷害内皮の修復に寄与する¹⁴⁾ほか、Akt活性化を介した一酸化窒素産生に関わっている。またS1P₁については米国のHlaらのグループにより、胎生期においては血管内皮のS1P₁機能が壁細胞の集積による血管壁成熟に必須の役割を担っていることが報告されている¹⁴⁾。さらに、血小板由来成長因子(PDGF)などの作用により内膜側へ遊走・増殖し、脱分化した平滑筋細胞(新生内膜細胞)ではS1P₁が高発現していることをわれわれは見出した¹⁵⁾。S1P₁はS1P刺激に反応して、近年心臓リモデリングの担い手として注目されている転写因子KLF5を介してPDGFの産生を媒介し、局所におけるPDGFオートクリン反応連鎖形成を通じて血管内腔狭窄に寄与すると考えられる所見を得ている¹⁶⁾。

おわりに

細胞運動は、癌の浸潤・転移のみならず、胎生期における器官・形態形成、生後では創傷治癒、炎症反応、動脈硬化性血管リモデリングなど、様々な生理的・病的な生命現象において重要な役割を担う基本的なプロセスである。細胞運動を抑制的に制御する最初の受容体としてわれわれが同定したS1P₂受容体は、ケモカイン受容体(がん細胞に発現した場合その転移を媒介しうる)のいわば対極に位置する。ケモカイン受容体はRacを活性化することにより細胞運動を促進する。ケモカインの他、LPAもLPA₁受容体を介し、Rac活性化により細胞運動を促進することが最近報告された。これに関連して興味深いのは、がん細胞の産生する自己刺激性細胞運動促進因子として従来注目されていたautotaxinが、じつは、血漿中に豊富に存在するリゾリン脂質であるリゾホスファチジルコリンを分解してLPAを産生する酵素、リゾホスホリパーゼDであったという最近の発見である¹⁶⁾。これら細胞運動促進性受容体とは対比的に、S1P₂受容体はRacを抑制することにより細胞運動を負に制御することが見出された最初の受容体である。われわれの報告の後、細胞運動抑制性G蛋白共役型受容体としてこれまでにメタチン/KISS-1受容体(GPR54)¹⁷⁾やトロンビン受容体(PAR1)¹⁸⁾などが報告された。これら受容体はRhoを活性化することが示されているが、Rac活性にどのような影響を及ぼすのかはまだ明らかにされていない。これらの受容体においても、G_{12/13}-Rhoを介してRac活性が負に制御されている可能性がある。

前述のように、G蛋白共役型受容体は最大の受容体ファミリーであり、これを標的とした薬剤の確固たる実績を鑑みるに、今後、がんの治療においてもG蛋白共役型受容体を標的とした

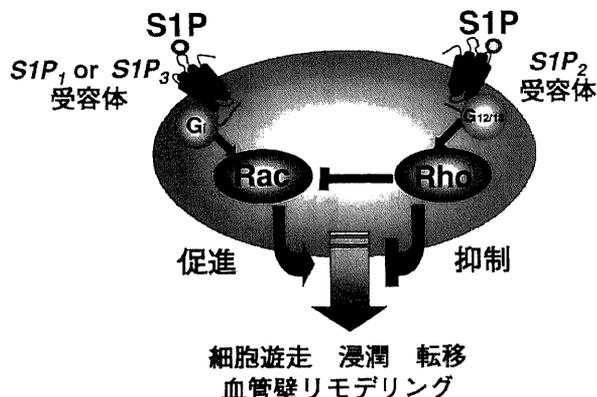


図7. S1P受容体サブタイプ特異的なRac活性制御と病態生理学的意義.

サブタイプ特異的薬剤が、抗癌剤、COX2阻害剤、成長因子受容体阻害抗体・薬剤などのリストに加えられ、効果を発揮する時代が来ると期待される。

謝 辞

本研究は血管分子生理学教室のメインプロジェクトの一つとして多くの大学院生、共同研究者とともに行った研究です。この場を借りてこれらの方々に謝意を表します。

文 献

- 1) H. Okamoto, N. Takuwa, K. Gonda, H. Okazaki, K. Chang, Y. Yatomi, H. Shigematsu and Y. Takuwa. EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways including phospholipase C activation, Ca²⁺ mobilization, Ras-MAPK activation, and adenylate cyclase inhibition. *J. Biol. Chem.* 273: 27104-27110, 1998.
- 2) K. Gonda, H. Okamoto, N. Takuwa, Y. Yatomi, H. Okazaki, T. Sakurai, S. Kimura, R. Sillard, K. Harii and Y. Takuwa. The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signalling pathways. *Biochem. J.* 337: 67-75, 1999.
- 3) H. Okamoto, N. Takuwa, Y. Yatomi, K. Gonda, H. Shigematsu and Y. Takuwa. EDG3 is a functional receptor specific for sphingosine-1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine with signaling characteristics distinct from EDG1 and AGR16. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 203-208, 1999.
- 4) H. Okamoto, N. Takuwa, T. Yokomizo, N. Sugimoto, S. Sakurada, H. Shigematsu and Y. Takuwa. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling and cell migration by sphingosine-1-phosphate receptor EDG5, but not EDG1 or EDG3. *Mol. Cell. Biol.* 20: 9247-9261, 2000.
- 5) Y. Takuwa, H. Okamoto, N. Takuwa, K. Gonda, N. Sugimoto and S. Sakurada. Subtype-specific, differential activities of the EDG family receptors for sphingosine-1-phosphate, a novel lysophospholipid mediator. *Mol. Cell. Endocrinol.* 177: 3-11, 2001.
- 6) Y. Takuwa, N. Takuwa, N. Sugimoto. The Edg G protein-coupled receptors for lysophospholipids: Their signaling properties and biological activities. *J. Biochem.* 131: 767-771, 2002.
- 7) Y. Takuwa. Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biophys. Biochim. Acta* 1582: 112-120, 2002.
- 8) N. Sugimoto, N. Takuwa, H. Okamoto, S. Sakurada and Y. Takuwa. Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G_{12/13}-Rho-and the G_i-pathways integrated downstream of a single G protein coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol. Cell. Biol.* 23: 1534-1545, 2003.
- 9) Y. Sadahira, F. Ruan, S. Hakomori and Y. Igarashi. Sphingosine 1-phosphate, a specific endogenous signaling molecule controlling cell motility and tumor cell invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 9686-9690, 1992.
- 10) K. Arikawa, N. Takuwa, H. Yamaguchi, N. Sugimoto, J. Kitayama, H. Nagawa, K. Takehara and Y. Takuwa. Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P₂ G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular Rac activity. *J. Biol. Chem.* 278: 32841-32851, 2003.
- 11) H. Yamaguchi, J. Kitayama, N. Takuwa, K. Arikawa, I. Inoki, K. Takehara, H. Nagawa and Y. Takuwa. Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific positive and negative regulation of Rac and hematogenous metastasis of melanoma cells. *Biochem. J.* 374: 715-722, 2003.
- 12) H. Okazaki, N. Ishizaka, T. Sakurai, K. Kurokawa, K. Goto, M. Kumada and Y. Takuwa. Molecular cloning of a novel putative G protein-coupled receptor expressed in the cardiovascular system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 1104-1109, 1993.
- 13) Y. Ryu, N. Takuwa, N. Sugimoto, S. Sakurada, S. Usui, H. Okamoto, O. Matsui and Y. Takuwa. Sphingosine-1-phosphate, a platelet-derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 90: 325-332, 2002.
- 14) S.S. Chae, F.H. Paik, H. Furneaux and T. Hla. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J. Clin. Invest.* 114: 1082-1089, 2004.
- 15) S. Usui, N. Sugimoto, N. Takuwa, S. Sakagami, S. Takata, S. Kaneko and Y. Takuwa. Boold lipid mediator sphingosine-1-phosphate potently stimulates platelet derived growth factor-A and-B chain expression through S1P₁-Gi-Ras-MAPK-dependent induction of Krüppel-like factor 5. *J. Biol. Chem.* 279: 12300-12311, 2004.
- 16) M. Umezu-Goto, Y. Kishi, A. Taira, K. Hama, N. Dohmae, K. Takio, T. Yamori, G.B. Mills, K. Inoue, J. Aoki and H. Arai. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J. Cell. Biol.* 158: 227-233, 2002.
- 17) T. Ohtaki, Y. Shintani, S. Honda, H. Matsumoto, A. Hori, K. Kanehashi, Y. Terao, S. Kumano, Y. Takatsu, Y. Masuda, Y. Ishibashi, T. Watanabe, M. Asada, T. Yamada, M. Suenaga, C. Kitada, S. Usuki, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura and M. Fujino. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411: 613-617, 2001.
- 18) L. Kamath, A. Meydani, F. Foss and A. Kuliopulos. Signaling from protease-activated receptor-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res.* 61: 5933-5940, 2001.